

Inducción hormonal de la maduración gonadal y la puesta en hembras de anguila europea *Anguilla anguilla* L., 1758: cambios morfológicos y desarrollo oocitario

J. F. Asturiano, L. Pérez, A. Tomás, S. Zegrari, F. J. Espinós y M. Jover

Grupo de Investigación en Recursos Acuícolas. Departamento de Ciencia Animal. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera, 14. E-46071 Valencia, España. Correo electrónico: jfastu@dca.upv.es

Recibido en julio de 2001. Aceptado en febrero de 2002.

RESUMEN

El objetivo principal del presente estudio fue la evaluación de distintos tratamientos hormonales para la inducción de la maduración gonadal y la puesta en hembras salvajes de anguila europea *Anguilla anguilla* L., 1758.

Un grupo recibió inyecciones semanales de extracto de hipófisis de salmón y gonadotropina coriónica humana, mientras que un segundo grupo recibió además pymozide. Aunque estudios previos habían logrado liberación espontánea de oocitos, en el presente estudio se empleó una dosis de 17,20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona (17,20 β P) durante las fases finales del desarrollo oocitario para inducir de forma controlada, por primera vez en la anguila europea, la ovulación y puesta.

Después de 12-14 semanas de tratamiento se obtuvieron 5 puestas. Los tratamientos también causaron cambios morfológicos, como el oscurecimiento de la coloración o el aumento del diámetro ocular.

Palabras clave: Reproducción, hormonas, ovario, oocito, hipófisis, gonadotropina, MIS.

ABSTRACT

Hormonal induction of gonadal maturation and spawning in European eel females *Anguilla anguilla* L., 1758: Morphological changes and oocyte development.

The present study assesses different hormonal treatments for the induction of gonadal maturation and spawning in female wild European eels *Anguilla anguilla* L., 1758.

One of the groups received weekly injections of salmon pituitary extract and human chorionic gonadotropin, while a second group received the same treatment together with pymozide. Although previous studies had reported spontaneous release of oocytes, in the present study, during the final phases of oocyte development, a dose of 17.20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (17.20 β P) was used to induce the first controlled spawning in *A. anguilla*.

After 12-14 weeks of treatment, 5 spawns were obtained. Treatments also caused morphological changes, such as progressively darker coloration and increase in eye diameter.

Keywords: Reproduction, hormones, ovary, oocyte, pituitary, gonadotropin, MIS.

INTRODUCCIÓN

La anguila europea *Anguilla anguilla* L., 1758 es una especie consumida tradicionalmente en varias zonas de España y otros países europeos. Se consumen tanto ejemplares adultos como angulas, que son capturadas en las desembocaduras de los ríos en otoño e invierno, y que llegan a alcanzar precios de hasta 75 000 PTA/kg (450,76 €/kg). Las angulas son, además, la base para la producción anual de las anguilifactorías.

Sin embargo, en las últimas décadas se ha producido un descenso alarmante en las capturas de angulas y anguilas adultas en toda el área de distribución de la especie (FAO, 2000). Como ejemplo, en la albufera de Valencia se pescaban 100 t/año de anguilas en la década de los años cincuenta, que se redujeron a 4240 kg en 1995, según los datos de la Consellería de Agricultura y Pesca, Generalitat Valenciana (inédito). La intensa demanda de angulas para la exportación a piscifactorías asiáticas, así como la importación de parásitos (*Anguillicola crassus* Kuwahara, Niimi e Itagaki, 1974) de la especie asiática (Koops y Hartmann, 1989; Kennedy y Fitch, 1990) ayudan a agravar esta situación, suponiendo una grave presión de captura sobre las poblaciones naturales y un aumento del coste de la producción acuícola de anguilas. El recurso genético y económico está, evidentemente, en peligro.

Esta situación justifica el desarrollo de técnicas de inducción artificial de la reproducción de esta especie tanto desde un punto de vista económico como desde una perspectiva ecológica. Por su parte, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación ha reconocido, dentro de las necesidades de investigación y desarrollo, su interés por el desarrollo de técnicas de control de la reproducción de esta especie (anónimo, 1999). Sin embargo, a pesar del interés económico y ambiental, actualmente todavía no se ha podido completar el ciclo reproductivo de las anguilas en cautividad.

Varios estudios han inducido la espermiación en machos de anguila europea (Boëtius y Boëtius, 1967, 1980; Dollerup y Graver, 1985; Amin, 1997; Pérez *et al.*, 1999, 2000), de anguila americana *Anguilla rostrata* Le Sueur, 1817 (Sorensen y Winn, 1984) y de anguila japonesa *Anguilla japonica* Temminck y Schlegel, 1847 (Ohta *et al.*, 1996a, b, 1997; Ohta y Tanaka, 1997).

En el caso de las hembras, es en la especie japonesa *A. japonica* donde se han logrado los mayores

avances. Los tratamientos basados en inyecciones de extractos de hipófisis inducen el crecimiento de los oocitos y la formación de vitelo (Yamamoto y Yamauchi, 1974; Satoh, Yamamori e Hibiya, 1992; Ijiri *et al.*, 1998). Los implantes de testosterona, sola o en combinación con estradiol, análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRHa) y antagonistas de la dopamina, también estimulan la formación de vitelo (Lin *et al.*, 1991). Yamauchi (1990) informó de la capacidad del 17,20 β -dihidroxi-4-pregnen-3-ona (17,20 β P), un esteroide inductor de la maduración (MIS), para inducir la puesta en la especie japonesa. Con posterioridad se ha tratado de mejorar las técnicas de inducción de la ovulación mediante estudios in vitro (Kagawa *et al.*, 1995), administración de MIS en las fases finales de maduración (Kagawa *et al.*, 1997; Ohta *et al.*, 1996a, 1997) o con el uso de implantes (Lin *et al.*, 1998).

En el caso de las hembras de anguila americana *A. rostrata* se han empleado con éxito tratamientos con hipófisis de salmón y carpa combinadas con hCG, sirviendo el 17,20 β P como inductor de la ovulación (Sorensen y Winn, 1984).

Los experimentos de inducción hormonal de la maduración en la anguila europea comenzaron ya en la década de los años sesenta. Desde entonces cabe destacar algunos estudios como los de Boëtius y Boëtius (1980) o Amin (1997) que, aplicando tratamientos combinados de hCG y extracto de hipófisis de carpa (CPE), lograron inducir índices gonadosomáticos (IGS) máximos de 60,7 y 68,4 % respectivamente, aunque tras extraer los oocitos mediante masaje abdominal sus ensayos de fertilización fracasaron. Villani y Lumare (1975), con hCG + CPE y, más tarde, Villani (1985) utilizando hCG y extracto de hipófisis de salmón, consiguieron la emisión espontánea de oocitos de 1 mm de diámetro, y Pankhurst (1992) describió los cambios morfológicos asociados con la maduración y llegó a observar oocitos con 1,2 mm de diámetro.

Hasta el momento no se ha aplicado en esta especie ningún MIS para regular la aparición de las puestas. El presente estudio aborda la inducción de la maduración gonadal en hembras de anguila europea con el objetivo de contar con oocitos para futuros ensayos de fecundación artificial. Los tratamientos utilizados se basan en el descrito por Ohta *et al.* (1996a, 1997) consistente en inyecciones semanales de extracto de hipófisis de salmón y administración de 17,20 β P para inducir la puesta.

Estudios anteriores con anguila europea (Dufour *et al.*, 1988; Kah *et al.*, 1989) y anguila japonesa (Lin *et al.*, 1990) han sugerido la existencia de un bloqueo dopaminérgico traducido en la inhibición de la síntesis y la liberación de gonadotropina en la hipófisis. El presente estudio pretende evaluar el efecto del pmozide, un bloqueador del receptor de dopamina, administrado en combinación con extracto de hipófisis y hCG.

Además, se registraron los cambios morfológicos causados por los distintos tratamientos hormonales para comprobar el desarrollo de una metamorfosis asociada al desarrollo gonadal de los ejemplares tratados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Origen y manejo de los animales

El experimento se realizó con 25 hembras salvajes de anguila procedentes de la albufera de Valencia, con un peso medio inicial de 452 ± 29 g. Se mantuvieron en agua dulce cerca de dos meses en las instalaciones del Centro Experimental de Especies de Aguas Templadas de Polinyà del Júcar, de la Generalitat Valenciana, donde se sometieron a tratamientos profilácticos (formol). Posteriormente se trasladaron al Laboratorio de Acuicultura del Departamento de Ciencia Animal, donde se realizó una aclimatación progresiva a agua salada, y se distribuyeron en tanques de 500 l, en circuito cerrado, equipados con mallas de rafia para mantener un ambiente de penumbra dado el carácter lucífugo de esta especie. Las anguilas fueron marcadas individualmente con nitrógeno líquido. El experimento tuvo una duración de 16 semanas; la temperatura del agua se mantuvo en 21 ± 1 °C las 7 primeras semanas y pasó después a 24 ± 1 °C hasta el final del experimento.

Tratamientos hormonales

Los métodos de inducción gonadal se basaron en los descritos por Ohta *et al.* (1996a, 1997), consistentes en inyecciones semanales de extracto de hipófisis de salmón (Argent Chemicals) y administración de 17,20 β P (Sigma) para inducir la puesta. Los tratamientos utilizados fueron:

PIT + hCG: Extracto de hipófisis de salmón (20 μ g/g pez) + hCG (1,5 IU/g pez).

PIT + hCG + PYM: Extracto de hipófisis de salmón (20 μ g/g pez) + hCG (1,5 IU/g pez) + pmozide (10 μ g/g pez).

Control: Volúmenes equivalentes de solución de Ringer.

En las fases finales del desarrollo oocitario se empleó una dosis 2 μ g/g pez de 17,20 β P para inducir la puesta.

Muestreos

Antes de iniciar los tratamientos, así como seis semanas después, se sacrificaron dos hembras para observar su estado de desarrollo gonadal. Se registró el aspecto de la gónada, el IGS y el aspecto histológico de los oocitos. Estas características también se observaron en las hembras que murieron tras las puestas y en las sacrificadas al final del experimento.

En cada muestreo semanal se realizaron una biometría de los peces (diámetro del ojo, peso, longitud total), anotaciones sobre la coloración corporal y de las aletas pectorales, así como canulaciones intraováricas, a partir de la décima semana, para comprobar el estado de desarrollo oocitario. Se midió el diámetro de los mayores oocitos de cada muestra, aunque en número variable dependiendo de cada muestra.

Histología

El tratamiento histológico de las muestras, procedentes de disecciones o resultado de las canulaciones intraováricas, consistió en una fijación con líquido de Bouin (ácido pícrico + formol + ácido acético, 15:5:1) durante 24 h, conservándose en etanol (70 %) hasta su procesado. La batería de deshidratación en etanol de concentración creciente y la inclusión en parafina (Paraplast plus) se realizaron con un procesador automático (Shandon Citadel 2000). Se realizaron cortes de 5 y 10 μ m, con un microtomo manual Shandon Hypercut, que se tiñeron por el método tradicional de hematoxilina-eosina. Las fotografías se realizaron a través de un microscopio óptico Zeiss Standard 25, con una cámara fotográfica (Ricoh XR-X3000) aco-

plada. En función de las preparaciones obtenidas, se midieron entre 8 y 30 oocitos de cada hembra. En los oocitos sin contorno esférico, la medida anotada fue el promedio entre el eje mayor y menor (West, 1990).

Estadística

Se utilizó un análisis de la varianza de una vía (Anova) para comparar entre grupos. Como test de comparación múltiple de las medias se usó un test de Student-Newman-Keuls. En los casos en los que los datos no pasaron el test de normalidad se recurrió a un Anova de rangos seguido de un test de Mann-Whitney. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. Todos los valores se expresan como media \pm error estándar (SEM).

RESULTADOS

Cambios morfológicos

Se produjo una importante pérdida de peso (15-20 %) en todas las hembras debida al ayuno durante el experimento, ya que las anguilas no se adaptaron a la alimentación ni siquiera antes de comenzar el tratamiento hormonal (figura 1). En las hembras que ovularon, se observó una recuperación del peso como consecuencia del desarrollo de la gónada, fundamentalmente en las fases fina-

les del desarrollo, dada la fuerte hidratación de los oocitos. La figura 2 muestra ejemplos concretos de tres de las hembras que llegaron a ovular.

Todas las hembras que recibieron tratamientos hormonales sufrieron un oscurecimiento de su coloración dorsal, así como de las aletas pectorales, que se hizo patente a partir de la cuarta semana de tratamiento. En estas hembras se observó también un incremento significativo del diámetro del ojo (figura 3). Sin embargo, el grupo control no mostró cambios en la coloración ni aumento del diámetro ocular.

Desarrollo oocitario e inducción de las puestas

Las gónadas de las hembras sacrificadas al inicio del experimento presentaban el aspecto macroscópico típico en forma de cinta rizada (Boëtius y Boëtius, 1967) y presentaban un IGS próximo al 1 %. Los oocitos se encontraban formando cordones, en estado previtelogénico, principalmente en el inicio de la fase de alveolo cortical (figura 4a). El diámetro medio de los oocitos en observación histológica fue de 75 ± 3 ($n = 9$) y 102 ± 2 μm ($n = 13$).

Tras seis semanas de tratamiento, los mayores oocitos, con un diámetro medio de 110 ± 4 y 105 ± 3 μm ($n = 10$) no parecían haber incrementado su tamaño con respecto al inicio del experimento, aunque se encontraban en una etapa más avanzada de la fase de alveolo cortical, con un mayor número de vesículas de menor tamaño agrupadas en la periferia (figura 4b).

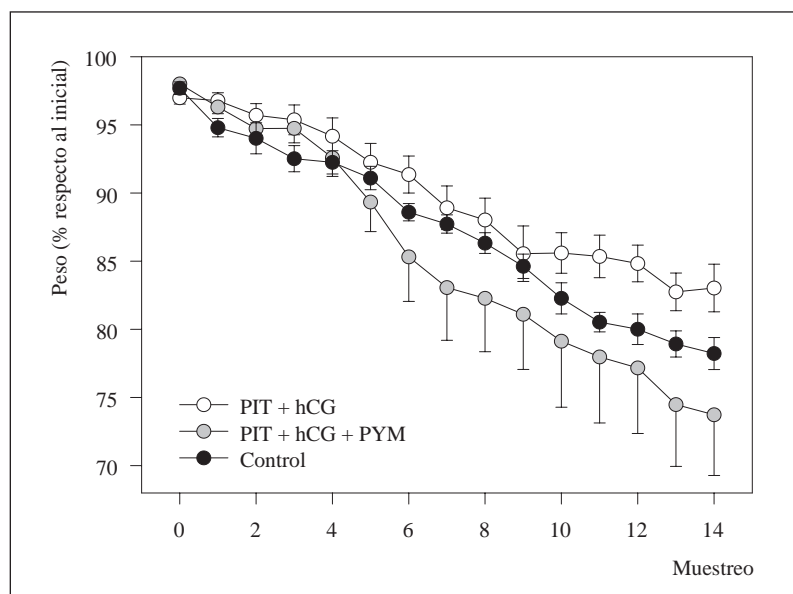
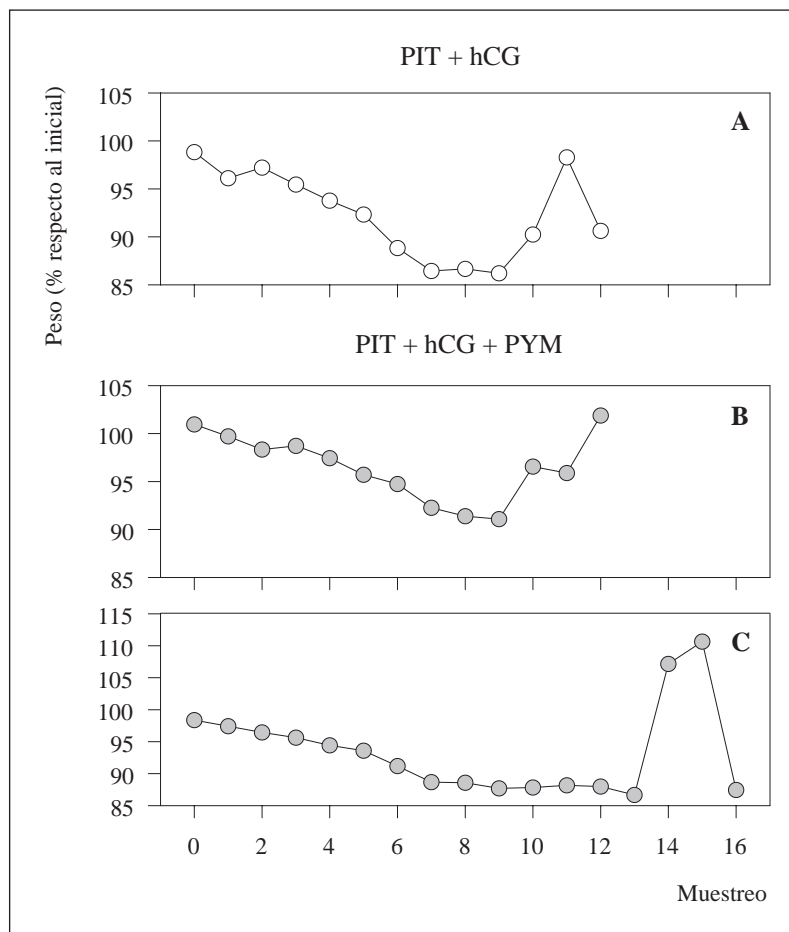


Figura 1. Variación del peso de las hembras, expresado como porcentaje con respecto al peso inicial, durante el experimento. Los datos se expresan como media \pm SEM dentro de cada grupo. La disminución resultó estadísticamente significativa dentro de cada grupo.

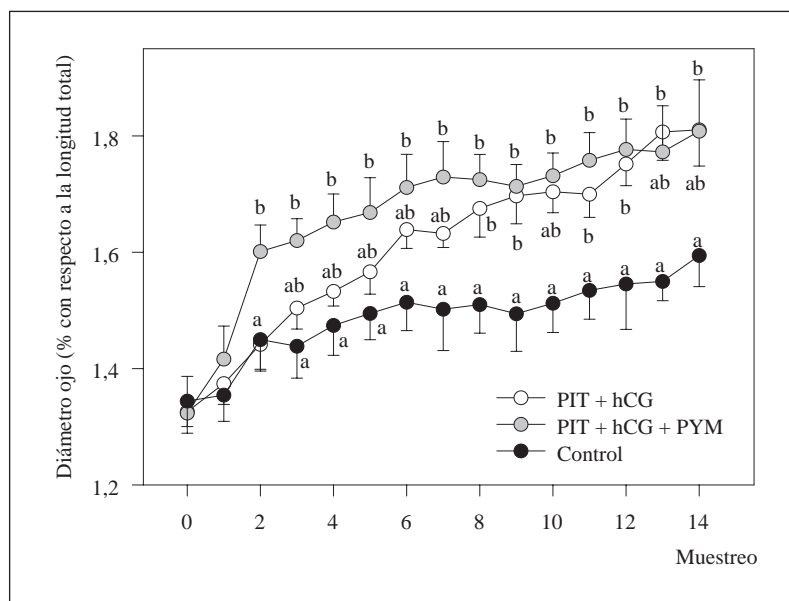
Figura 2. Ejemplos de la variación de peso de tres hembras concretas tratadas con PIT + hCG (A) o con PIT + hCG + PYM (B, C) que llegaron a ovular, mostrando la recuperación de peso en estos ejemplares durante las fases finales del desarrollo gonadal.



Durante la décima semana, algunas de las hembras de ambos tratamientos hormonales presentaban el abdomen dilatado. Los oocitos obtenidos por canulación intraovárica presentaban diámetros

de 400-500 μm y un aspecto opaco (figura 4c); otros, con un diámetro de 750-900 μm , mostraban un halo periférico transparente y numerosas gotas lipídicas centrales (figura 4d).

Figura 3. Variación del diámetro ocular, expresado como porcentaje con respecto a la longitud total de los ejemplares. Los datos se expresan como media \pm SEM dentro de cada grupo. El aumento registrado entre el inicio y el final del experimento resultó estadísticamente significativo en los grupos de hembras tratadas con PIT + hCG o con PIT + hCG + PYM, y no significativo en el grupo control. Las letras indican diferencias estadísticas entre los grupos en cada uno de los muestreos.



Tres días más tarde, en dos hembras se encontraron oocitos de 900-1000 μm , junto con otros más pequeños y opacos. En los oocitos grandes se observó fusión de las gotas lipídicas (figura 4e) y, en algunos, migración de la vesícula germinal (figura 4f). Esta primera cohorte de oocitos degeneró sin que se diesen puestas y, coincidiendo con el muestreo semanal número 11, se detectó una nueva oleada de oocitos más pequeños (340-600 μm) y opacos, y también algunos oocitos grandes (1000-1200 μm) con numerosas vesículas lipídicas.

A partir del muestreo número 12 pudieron canularse todas las hembras tratadas con pesos comprendidos entre 350 y 1000 g. Tras observar el estado de desarrollo de los oocitos de cada hembra se inyectó, a las 11:00 a.m., una dosis de 2 $\mu\text{g/g}$ de 17,20 βP para inducir la puesta. El tratamiento no tuvo ningún efecto visible sobre una hembra que mostró unos oocitos con diámetros máximos en torno a las 400 μm . Sin embargo, provocó la puesta en hembras cuyos oocitos presentaron unos diámetros máximos entre 450 y 1200 μm . El tratamiento produjo la liberación espontánea de distintas cantidades de oocitos a las 24 h (figuras 5a

y 5b) y en todos los casos se obtuvieron más oocitos mediante masaje abdominal. La proporción de oocitos flotantes en agua de mar varió en cada caso.

Estas hembras murieron algunas horas o días después de realizar las puestas. En su disección se observó que la cavidad abdominal estaba completamente ocupada por el ovario (IGS de 20-25 %). Los oocitos presentes se encontraban en distintos estados de desarrollo, predominando la vitelogénesis avanzada (figuras 5c y 5d) y observándose algunos en fase de migración de la vesícula germinal (figura 5e).

Al finalizar el experimento tras 16 semanas de tratamiento, los oocitos presentes en los ovarios de las hembras del grupo control se encontraban en fase de vitelogénesis inicial (figura 5f) mostrando un diámetro medio máximo de $107 \pm 3 \mu\text{m}$ ($n = 22$).

En resumen, entre las 12 y 15 semanas de tratamiento se produjeron tres puestas en hembras tratadas con PIT + hCG + PYM y otras dos en hembras tratadas con PIT + hCG. Las puestas se recogieron 24 h después de la inyección de 17,20 βP , y llegaron a recogerse 150 ml de oocitos (entre los expulsados por la hembra y los obtenidos por masaje abdominal) de aproximadamente 1 mm de diámetro.

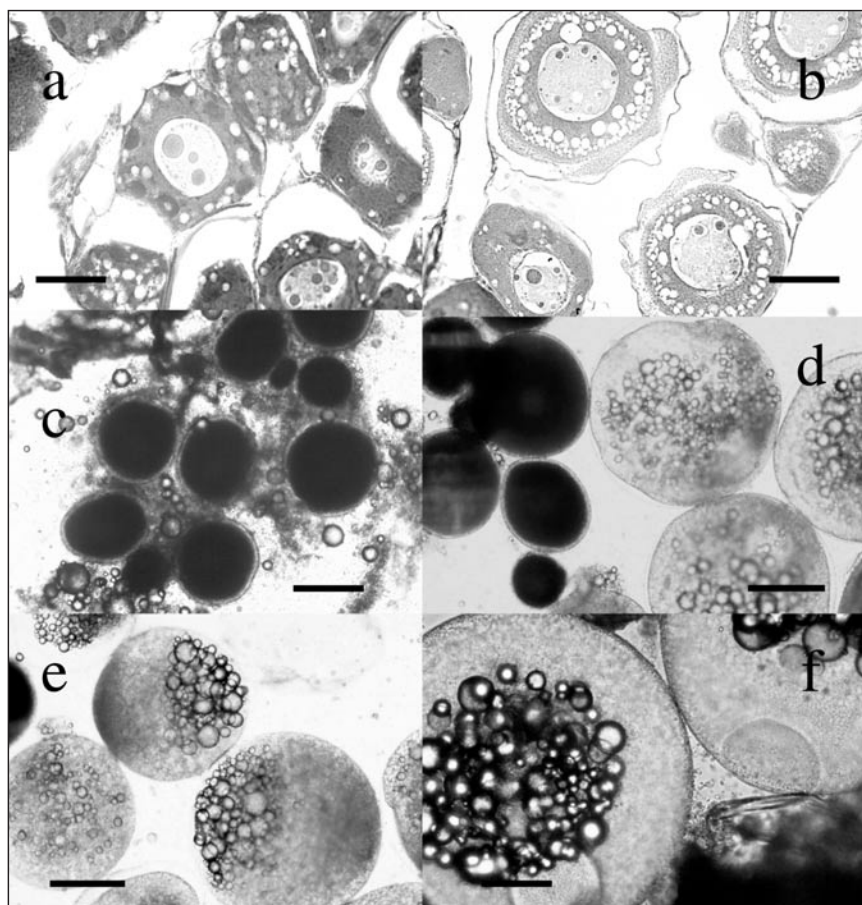


Figura 4. (a): Detalle de la gónada al inicio del experimento; oocitos en inicio de vitelogénesis (alveolo cortical); escala barra: 75 μm ; (b): oocitos en fase de alveolo cortical; semana 7.^a; escala barra: 75 μm ; (c): oocitos en fresco obtenidos por canulación intraovárica; semana 10.^a; escala barra: 500 μm ; (d): oocitos preovulatorios en varios estadios; semana 11.^a; escala barra: 500 μm ; (e): oocito con fusión y acumulación de gotas lipídicas en un polo; escala barra: 500 μm ; (f): oocitos en fase de migración de la vesícula germinal; semana 12.^a (antes de la inducción); escala barra: 250 μm .

DISCUSIÓN

Los principales cambios morfológicos observados en las hembras de anguila europea a lo largo del experimento han sido el oscurecimiento de la coloración dorsal y de las aletas pectorales, el desarrollo de la línea lateral y el incremento del diámetro ocular, coincidiendo con lo observado en varios estudios anteriores (revisados por Pankhurst, 1982). De hecho, algunos de estos estudios han tratado de establecer correlaciones entre algunas de estas variables, fundamentalmente el tamaño ocular (la característica más fácilmente medible externamente) y el estado de desarrollo del ovario (Pankhurst, 1982) o el estado de maduración del testículo (Dollerup y Graver, 1985). Beullens *et al.* (1997) rechazaron la aplicabilidad de este método en machos y en hembras de anguila procedentes de piscifactoría en los que, según estos autores, aparece la metamorfosis externa pero sin desarrollo gonadal paralelo. Pérez *et al.* (1999, 2000) describieron un aumento del diámetro ocular en machos de anguila procedentes de piscifactoría y tratados con hCG y que llegaron a producir esper-

ma, aunque, coincidiendo con lo propuesto por Beullens *et al.* (1997), no se observaron diferencias significativas con los machos del grupo control. Sin embargo, Pérez *et al.* (1999, 2000) propusieron que la ausencia de diferencias pudo deberse, más que al origen de los animales, al efecto del cambio a agua de mar o a la presencia de feromonas en el agua (revisado por Kime, 1993) que pudieron afectar a los ejemplares del grupo control, ya que todos los grupos se mantuvieron en un mismo circuito cerrado.

Los resultados del presente estudio sirven para corroborar el aumento significativo del diámetro ocular en hembras salvajes tratadas hormonalmente, a diferencia de lo observado en el grupo control, apoyando la validez de la observación de esta característica morfológica como método de estima del grado de madurez sexual en las hembras de esta especie y como criterio para evaluar el efecto de los tratamientos hormonales aplicados. Sin embargo, este método tiene la limitación de clasificar a las hembras sólo como «sexualmente inmaduras» o «en proceso de maduración sexual» (Pankhurst, 1982).

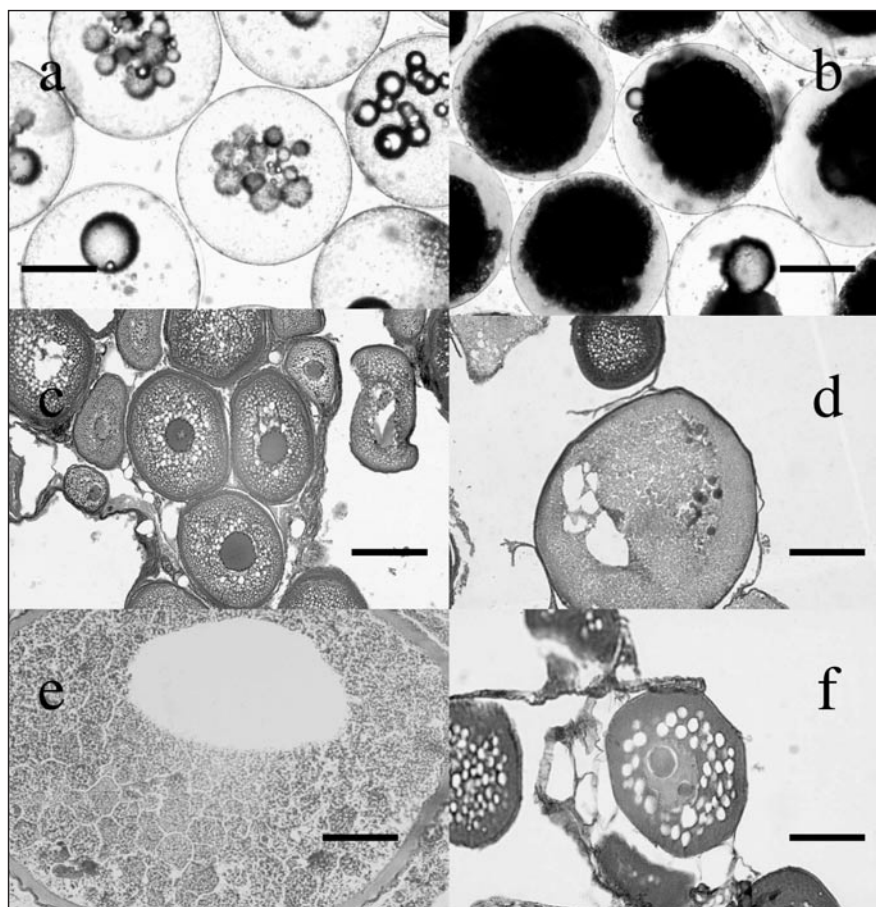


Figura 5. (a): Oocitos flotantes obtenidos de una hembra tratada con PIT + hCG; (b): oocitos no flotantes procedentes de la misma hembra; escala barras: 250 µm; (c): oocitos vitelogénicos, en restos ováricos, en postpuesta; escala barra: 250 µm; (d): oocito en vitelogénesis avanzada, con fusión de gotas lipídicas, en restos ováricos en postpuesta; escala barra: 250 µm; (e): oocito en fase de migración de la vesícula germinal, con fusión de gotas lipídicas, en restos ováricos en postpuesta; escala barra: 75 µm; (f): hembra control; semana 16.^a, oocito en inicio de la fase de alveolo cortical; escala barra: 75 µm.

Según los resultados obtenidos, se puede concluir que los tratamientos hormonales utilizados son eficaces para inducir la maduración gonadal y la puesta en la anguila europea. Por otro lado, el hecho de haber obtenido puestas tanto en hembras tratadas con pymozide como en hembras que no lo recibieron, hace suponer que el bloqueo dopaminérgico no resulta demasiado intenso en esta especie, en contra de lo sugerido en estudios anteriores (Dufour *et al.*, 1988; Kah *et al.*, 1989), o bien puede ser obviado por el efecto de la administración de gonadotropinas (Dufour *et al.*, 1989), que inducen la síntesis de esteroides en la gónada los que, a su vez, ejercen un efecto positivo sobre los niveles de GTH y GnRH.

El presente estudio ha sido realizado con hembras adultas capturadas en el medio natural. Chiba *et al.* (1994) encontraron que tanto las hembras salvajes como las procedentes de piscifactoría respondían a los tratamientos de inducción hormonal del desarrollo gonadal. Nuestros propios resultados parecen confirmar este punto tanto en el caso de machos (Pérez *et al.*, 1999, 2000) como en el caso de hembras (observación no publicada). Sin embargo, los resultados de estos tratamientos en anguila japonesa son más variables si se aplican a hembras procedentes de piscifactoría (Ijiri *et al.*, 1995, 1998). Además el estado de desarrollo inicial de los oocitos está directamente relacionado con su capacidad de respuesta a los tratamientos inductores de la maduración (Ijiri *et al.*, 1998). Así, estos mismos autores señalaron 180 μm como el diámetro mínimo para garantizar que los oocitos podían ser inducidos hasta la fase final de maduración, y este diámetro sólo fue encontrado en hembras salvajes o en ejemplares feminizados de la especie japonesa.

Es conveniente partir de ejemplares con cierto grado de maduración porque los tratamientos cortos previenen la aparición de inmunorreacción frente al extracto de hipófisis y reducen el estrés causado por el manejo. Se hace pues necesario investigar cuál es el estado de los oocitos en hembras cautivas de anguila europea y determinar el estado de desarrollo mínimo necesario para que su maduración gonadal pueda ser inducida con éxito.

Algunas de las hembras que llegaron a desovar murieron pocas horas después. Este fenómeno también se ha observado en los machos coincidiendo con el final de su periodo de espermiación (Pérez *et al.*, 2000) y podría deberse al ciclo natural

de la especie, o bien a un deficiente estado nutricional antes del comienzo de la maduración. Otras hembras, por el contrario, continuaban vivas dos semanas después de la puesta y, tanto unas como otras, mostraban tras las puestas un IGS elevado y las muestras histológicas mostraban en sus ovarios oocitos en distintos estados de desarrollo. Esto sugiere que el desarrollo ovárico en esta especie podría ser de tipo sincrónico por grupos, dándose el desarrollo de los oocitos en varias cohortes, y pudiendo esperar varias puestas de forma consecutiva en cada hembra.

Estudios *in vivo* e *in vitro* en salmónidos han demostrado que cuando los folículos alcanzan la fase de postvitelogénesis, se produce un aumento de los niveles de GTH2 que induce la síntesis de andrógenos y la disminución de su aromatización a estradiol, mientras que se activan las enzimas implicadas en la síntesis de MIS (Nagahama *et al.*, 1995). Los progestágenos 17,20 βP y 17,20 β ,21-trihidroxi-4-pregnen-3-ona (20 βS) han sido identificados como los MIS propios de muchas especies de teleósteos (Kime, 1993; Asturiano, 1999; Asturiano *et al.*, 2000). En el presente estudio, se ha empleado el 17,20 βP como MIS para inducir la puesta de forma controlada por primera vez en la anguila europea. Esta elección se debe a que este progestágeno ha sido identificado como MIS en otras especies (Nagahama, 1997), incluyendo la anguila japonesa (Yamauchi, 1990). También se ha detectado una intensa síntesis *in vitro* de 17,20 βP en oocitos de anguila neozelandesa *Anguilla dieffenbachii* Gray, 1842 (Lokman y Young, 1995).

Pese al buen resultado obtenido con el 17,20 βP , la anguila europea podría tener más de un MIS controlando las fases finales de maduración oocitaria y ovulación, tal y como ocurre en otras especies. Por otro lado, también cabe la posibilidad de que la dosis necesaria de MIS sea diferente a la empleada para inducir eficazmente la puesta e incluso facilitar la aparición de más de una puesta. Se hacen necesarios nuevos experimentos para comprobar *in vivo* e *in vitro* el posible papel de otros progestágenos como el 20 βS , y ensayar diferentes dosis de MIS buscando una mayor calidad de las puestas.

Además, es necesario determinar los criterios para decidir en qué momento debe administrarse un tratamiento de inducción de la puesta mediante la inyección de MIS. Por ejemplo, estudios *in vitro* sirvieron para determinar que existe un diámetro mínimo, próximo a las 600 μm , para garantizar que

los oocitos de lubina europea *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758) respondan eficientemente a un tratamiento hormonal inductor de la ovulación (Asturiano *et al.*, 1997). En anguila japonesa se han empleado como criterios la detección de un incremento de peso que haga alcanzar el 110 % del peso inicial, o bien un diámetro mínimo de los oocitos de 700 μm , coincidiendo con la fase de migración del núcleo (Kagawa *et al.*, 1995, 1997; Ohta *et al.*, 1996a). Según los resultados del presente estudio, el diámetro mínimo de los oocitos en la anguila europea puede estar en torno a las 700 μm , de forma similar a lo encontrado en la especie japonesa. Nuevos experimentos *in vivo* e *in vitro* podrían aclarar este punto.

Asimismo, otro factor crítico para obtener oocitos de buena calidad parece ser el momento de recogida de las puestas. En la anguila japonesa se ha comprobado que las puestas se producen entre las 14 y las 23 h después de la administración de 17,20 βP , a las mismas dosis que la empleada en el presente estudio, con un máximo a las 17-20 h (Ohta *et al.*, 1996a; Kagawa *et al.*, 1997). Las tasas de fecundación y eclosión fueron bastante más elevadas en los oocitos de las hembras que ovularon antes (Kagawa *et al.*, 1997). Por tanto, en futuros experimentos se deberían realizar muestreos de ovulación a partir de las 14-15 h tras la inyección de 17,20 βP .

Aparecieron diferencias significativas en el peso medio de las hembras que no pudieron ser ni siquiera canuladas y el resto de hembras tratadas. El peso medio inicial de las primeras era de $324,9 \pm 86,7$ g; en las que pudieron al menos canularse, el peso medio inicial fue de $655,7 \pm 79,1$ g, y el de las que alcanzaron la maduración fue de $684,6 \pm 116,6$ g. Atendiendo a esto, y a que las primeras y mejores puestas se obtuvieron en anguilas de más de 650 g de peso inicial, parecería lógico usar en próximos experimentos únicamente anguilas a partir de 600-650 g.

En la vejiga natatoria de algunos de los ejemplares que no maduraron hasta la puesta se observaron ejemplares del parásito *Anguillicola crassus*. La presencia de este nematodo podría haber interferido en el desarrollo gonadal, por lo que sería interesante detectar su presencia en anguilas para futuros estudios sobre la reproducción de esta especie.

Como resumen puede concluirse que son todavía muchos los factores que deben ser estudiados para la correcta inducción hormonal de la puesta en la anguila europea.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por el IMPIVA (Generalitat Valenciana; IMTEFA/1998/21) y se ha realizado en colaboración con la empresa Valenciana de Acuicultura, S.A. Los autores quieren agradecer a Andrés Moñino y a Jorge A. Perán su colaboración técnica en el mantenimiento de los animales y durante el desarrollo de los muestreos, y al personal del Centro Experimental de Especies de Aguas Templadas de Polinyà del Júcar su colaboración en el mantenimiento de las hembras en la fase previa. J. F. Asturiano cuenta con un contrato del programa Ramón y Cajal, cofinanciado por la Universidad Politécnica de Valencia y el Ministerio de Ciencia y Tecnología.

BIBLIOGRAFÍA

- Amin, E. M. 1997. Observations on reproduction techniques applicable to the European eel (*Anguilla anguilla* L.). En: *Genetics and breeding of Mediterranean aquaculture species*. D. Bartley y B. Basurco (eds.). *Cahiers Options Méditerranéennes* 34: 223-234.
- Asturiano, J. F. 1999. El proceso reproductivo de la lubina europea (*Dicentrarchus labrax*, L.). Efectos de los ácidos grasos de la dieta: estudios *in vivo* e *in vitro*. Tesis doctoral. Universidad de Valencia. Valencia, España: 251 pp.
- Asturiano, J. F., L. A. Sorbera, J. Ramos, M. Carrillo y S. Zanuy. 1997. Patrón de maduración y ovulación durante la época natural de puesta de la lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) y observaciones sobre la inducción de la maduración de oocitos con gonadotropina. En: *Actas VI Congreso Nacional de Acuicultura* (9-11 julio, 1997. Cartagena, Murcia, España). J. de Costa *et al.* (eds.): 347-352. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- Asturiano, J. F., L. A. Sorbera, J. Ramos, D. E. Kime, M. Carrillo y S. Zanuy. 2000. Hormonal regulation of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) reproductive cycle: an individualized female approach. *Journal of Fish Biology* 56: 1155-1172.
- Beullens, K., E. H. Eding, F. Ollevier, J. Komen y C. J. J. Richter. 1997. Sex differentiation, changes in length, weight and eye size before and after metamorphosis of European eel (*Anguilla anguilla* L.) maintained in captivity. *Aquaculture* 153: 151-162.
- Boëtius, I. y J. Boëtius. 1967. Studies in the European eel, *Anguilla anguilla* (L.). Experimental induction of the male sexual cycle, its relation to temperature and other factors. *Meddelelser fra Danmarks Fiskeri- og Havundersøgelser* 4 (11): 339-405.
- Boëtius, I. y J. Boëtius. 1980. Experimental maturation of female silver eels, *Anguilla anguilla*. Estimates of fecundity and energy reserves for migration and spawning. *Dana* 1: 1-28.

- Chiba, H., K. Iwatsuki, K. Hayami, A. Hara y K. Yamauchi. 1994. Changes in serum steroid hormones and vitellogenin levels in cultured female European eels *Anguilla anguilla* during artificially induced ovarian development. *Journal of the World Aquaculture Society* 25 (4): 553-560.
- Dollerup, J. y C. M. Graver. 1985. Repeated induction of testicular maturation and spermiation, alternating with periods of feeding and growth in silver eels, *Anguilla anguilla* L. *Dana* 4: 19-39.
- Dufour, S., E. López, F. Le Menn, N. LeBelle, S. Baloché y Y. A. Fontaine. 1988. Stimulation of gonadotropin release and of ovarian development, by the administration of a gonadoliberein agonist and of dopamine agonists, in female silver eel pretreated with estradiol. *General and Comparative Endocrinology* 70: 20-30.
- Dufour, S., N. LeBelle, S. Baloché y Y. A. Fontaine. 1989. Positive feedback control by the gonads on gonadotropin (GTH) and gonadoliberein (GnRH) levels in experimentally matured female silver eels, *Anguilla anguilla*. *Fish Physiology and Biochemistry* 7: 157-162.
- FAO. 2000. Bases de datos estadísticas. <http://www.fao.org>. Departamento de Pesquerías, FAO. Roma.
- Ijiri, S., Y. Kazeto, N. Takeda, H. Chiba, S. Adachi y K. Yamauchi. 1995. Changes in serum steroid hormones and steroidogenic ability of ovarian follicles during artificial maturation of cultivated Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 135: 3-16.
- Ijiri, S., T. Kayaba, N. Takeda, H. Tachiki, S. Adachi y K. Yamauchi. 1998. Pretreatment reproductive stage and oocyte development induced by salmon pituitary homogenate in the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Science* 64 (4): 531-537.
- Kah, O., S. Dufour, S. Baloché y B. Breton. 1989. The GnRH systems in the brain and pituitary of normal and hCG treated European silver eels. *Fish Physiology and Biochemistry* 6 (5): 279-284.
- Kagawa, H., H. Tanaka, H. Ohta, K. Okuzawa y K. Hirose. 1995. *In vitro* effects of 17 α -hydroxy progesterone and 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one on final maturation of oocytes at various developmental stages in artificially matured Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Science* 61 (6): 1012-1015.
- Kagawa, H., H. Tanaka, H. Ohta, K. Okuzawa y N. Iinuma. 1997. Induced ovulation by injection of 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one in the artificially matured Japanese eel with special reference to ovulation time. *Fisheries Science* 63 (3): 365-367.
- Kennedy, C. R. y D. J. Fitch. 1990. Colonisation, larval survival, and epidemiology of the nematode *Anguillicola crassus*, parasite in the eel *Anguilla anguilla* in Britain. *Journal of Fish Biology* 36: 117-131.
- Kime, D. E. 1993. «Classical» and «non-classical» reproductive steroids in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 3: 160-180.
- Koops, H. y F. Hartmann. 1989. *Anguillicola* infestations in Germany and in German eel imports. *Journal of Applied Ichthyology* 1: 41-45.
- Lin, H., M. Zhang, S. Zhang, G. van der Kraak y R. Peter. 1990. Effects of sex steroids, (D-Ala⁶, Pro⁹-N-ethylamide) – LHRH (LHRH-A) and domperidone (DOM) on gonadotropin secretion in female silver eel, *Anguilla japonica* Temminck & Schlegel. En: *The Second Asian Fisheries Forum*. R. Hirano y I. Hanyu (eds.): 591-594. Asian Fisheries Society. Manila, Filipinas.
- Lin, H., M. Zhang, S. Zhang, G. van der Kraak y R. Peter. 1991. Stimulation of pituitary gonadotropin and ovarian development by chronic administration of testosterone in female Japanese silver eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 96: 87-95.
- Lin, H., G. Xie, L. Zhang, X. Wang y L. Chen. 1998. Artificial induction of gonadal maturation and ovulation in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* 349: 163-176.
- Lokman, P. M. y G. Young. 1995. *In vitro* biosynthesis of oestradiol-17 β and 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one by vitellogenic ovarian follicles from migrating New Zealand longfinned eels (*Anguilla dieffenbachii*). *Aquaculture* 135: 17-26.
- MAPA. 1999. *El futuro de la anguicultura en España y problemas que inciden en su desarrollo*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid: 78 pp.
- Nagahama, Y. 1997. 17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one, a maturation-inducing hormone in fish oocytes: mechanisms of synthesis and action. *Steroids* 62: 190-196.
- Nagahama, Y., M. Yoshikuni, M. Yamashita, T. Tokumoto y Y. Katsu. 1995. Regulation of oocyte growth and maturation in fish. *Curr. Top. Dev. Biol.* 30: 103-145.
- Ohta, H., H. Kagawa, H. Tanaka, K. Okuzawa y K. Hirose. 1996a. Changes in fertilization and hatching rates with time after ovulation induced by 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 139: 291-301.
- Ohta, H., H. Kagawa, H. Tanaka, K. Okuzawa y K. Hirose. 1996b. Milt production in the Japanese eel *Anguilla japonica* induced by repeated injections of human chorionic gonadotropin. *Fisheries Science* 62 (1): 44-49.
- Ohta, H. y H. Tanaka. 1997. Relationship between serum levels of human chorionic gonadotropin (hCG) and 11-ketotestosterone after a single injection of hCG and induced maturity in the male Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture* 153: 123-134.
- Ohta, H., H. Kagawa, H. Tanaka, K. Okuzawa, N. Iinuma y K. Hirose. 1997. Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Physiology and Biochemistry* 17: 163-169.
- Pankhurst, N. W. 1982. Relation of visual changes to the onset of sexual maturation in the European eel *Anguilla anguilla* (L.). *Journal of Fish Biology* 21: 127-140.
- Pérez, L., J. F. Asturiano, A. Tomás, S. Zegrari, F. J. Espinós, R. Barrera y M. Jover. 1999. Inducción de la espermiación con gonadotropina en la anguila europea (*Anguilla anguilla*). Estudio de la evolución de la morfología externa y de los parámetros de calidad del esperma. En: *Libro de resúmenes. 7.º Congreso Nacional de Acuicultura* (19-21 mayo, 1999. Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas, España). Resumen P-160: p. 211.
- Pérez, L., J. F. Asturiano, A. Tomás, S. Zegrari, R. Barrera, F. J. Espinós, J. C. Navarro y M. Jover. 2000. Induction of

- maturation and spermiation in the male European eel: assessment of sperm quality throughout treatment. *Journal of Fish Biology* 57: 1488-1504.
- Satoh, H., K. Yamamori y T. Hibiya. 1992. Induced spawning of the Japanese eel. *Nippon Suisan Gakkaishi* 58: 825-832.
- Sorbera, L. A., J. F. Asturiano, M. Carrillo, J. Cerdà, D. E. Kime y S. Zanuy. 1999. *In vitro* oocyte maturation in the sea bass: effects of hCG, pituitary extract and steroids. *Journal of Fish Biology* 55: 9-25.
- Sorensen, P. W. y H. E. Winn. 1984. The induction of maturation and ovulation in American eels, *Anguilla rostrata* (LeSueur), and the relevance of chemical and visual cues to male spawning behaviour. *Journal of Fish Biology* 25: 261-268.
- Villani, P. 1985. Artificial maturation of female silver eels, *Anguilla anguilla* L., induced by gonadotropin and pituitary hormones. *Nova Thalassia* 7: 63-70.
- Villani, P. y F. Lumare. 1975. Nota sull'accrescimento ovarico indotto in *Anguilla anguilla* (L.). *Investigación Pesquera* 39 (1): 187-197.
- West, G. 1990. Assessing ovarian development in fishes. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 41: 199-222.
- Yamamoto, K. y K. Yamauchi. 1974. Sexual maturation of Japanese eel and production of eel larvae in the aquarium. *Nature* 251: 220-222.
- Yamauchi, K. 1990. Studies of gonadal steroids involved in final gonadal maturation in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. A review. *Int. Revue Ges. Hydrobiol.* 75: 859-860.